

DOCKET NO: 0384-0049-0 PCT

Rec'd PCT/PTO

09/508514

24 MAR 2000

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

IN RE APPLICATION OF: Patrick DUWAT, et al.

SERIAL NO.: NEW U.S. PCT APPLICATION

FILED: HERewith

INTERNATIONAL APPLICATION NO.: PCT/IB99/01430

INTERNATIONAL FILING DATE: JULY 26, 1999

FOR: PROCESS FOR PREPARING STARTER CULTURES OF LACTIC ACID
BACTERIA

REQUEST FOR PRIORITY UNDER 35 U.S.C. 119
AND THE INTERNATIONAL CONVENTION

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

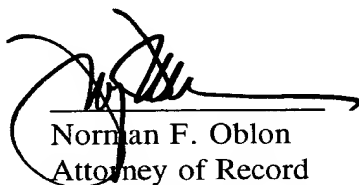
Sir:

In the matter of the above-identified application for patent, notice is hereby given that
the applicant claims as priority:

<u>COUNTRY</u>	<u>APPLICATION NO</u>	<u>DAY/MONTH/YEAR</u>
FRANCE	98/09463	24 JULY 1998

Certified copies of the corresponding Convention application(s) were submitted to
the International Bureau in PCT Application No. **PCT/IB99/01430**.

Respectfully submitted,
OBLON, SPIVAK, McCLELLAND,
MAIER & NEUSTADT, P.C.



Norman F. Oblon
Attorney of Record
Registration No. 24,618
William E. Beaumont
Registration No. 30,996

Crystal Square Five
Fourth Floor
1755 Jefferson Davis Highway
Arlington, Virginia 22202
(703) 413-3000

09/508514
PCT / IB 99 / 01430

18.08.99

BREVET D'INVENTION

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION

REC'D 23 AUG 1999

WIPO PCT

COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le **- 2 AOUT 1999**

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

**PRIORITY
DOCUMENT**
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersburg
75800 PARIS Cédex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04
Télécopie : 01 42 93 59 30



REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08

Téléphone : (1) 42.94.52.52 Télécopie : (1) 42.93.59.30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Réserve à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES

24 JUIL 1998

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

DÉPARTEMENT DE DÉPÔT

DATE DE DÉPÔT

98 09463

24 JUIL. 1998

Cabinet ORES
6, Avenue de Messine
75008 Paris

2 DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle

☒ brevet d'invention ☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité ☐ transformation d'une demande de brevet européen

☐ demande initiale
☒ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent références du correspondant téléphone
IFB 98 AO INR COC 0142810958

Établissement du rapport de recherche

☐ différé ☒ immédiat

date

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui ☐ non

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

PROCEDE DE PREPARATION DE CULTURES DE BACTERIES LACTIQUES "

3 DEMANDEUR (S)

n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

INSTITUT NATIONAL DE LA RECHERCHE AGRONOMIQUE

Forme juridique

Nationalité (s) Française

Adresse (s) complète (s)

147, rue de l'Université
75338 PARIS CEDEX 07

Pays

FRANCE

4 INVENTEUR (S) Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui ☒ non Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES

☐ requise pour la 1ère fois ☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 DIVISIONS antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE

(nom et qualité du signataire - n° d'inscription)

Charles DEMACHY (422.5/PP.170), Co-Gérant
GROSSET-FOURNIER & DEMACHY SARL

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRES ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI



DÉSIGNATION DE L'INVENTEUR

(si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

DEPARTEMENT DES BREVETS

26bis, rue de Saint-Petersbourg MJPcb539/94FR
75800 Paris Cédex 08
Tél. : 01 53 04 53 04 - Télécopie : 01 42 93 59 30

N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL

98 09463

TITRE DE L'INVENTION :

PROCEDE DE PREPARATION DE CULTURES DE BACTERIES LACTIQUES

LE(S) SOUSSIGNÉ(S)

CABINET ORES

6, avenue de Messine

75008 PARIS

DÉSIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) (indiquer nom, prénoms, adresse et souligner le nom patronymique) :

- DUWAT Patrick
144, avenue de la République
92120 MONTRouGE, FRANCE
- SOURICE Sophie
21, rue Louis Lumière
L'Acacia
44000 NANTES, FRANCE
- GRUSS Alexandra
25, rue Louis Scocard
91400 ORSAY, FRANCE

NOTA : A titre exceptionnel, le nom de l'inventeur peut être suivi de celui de la société à laquelle il appartient (société d'appartenance) lorsque celle-ci est différente de la société déposante ou titulaire.

Date et signature (s) du demandeur (s) ou du mandataire

Paris, le 24 juin 1999

VIALLE-PRESLES Marie-José (n° 93-2009)

DOCUMENT COMPORTANT DES MODIFICATIONS

PAGE(S) DE LA DESCRIPTION OU DES REVENDEICATIONS OU PLANCHE(S) DE DESSIN			R.M.*	DATE DE LA CORRESPONDANCE	TAMPON DATEUR DU CORRECTEUR
Modifiée(s)	Supprimée(s)	Ajoutée(s)			
11			X	26/11/98	03 DEC. 1998 - SR

Un changement apporté à la rédaction des revendications d'origine, sauf si celui-ci découle des dispositions de l'article R.612-36 du code de la Propriété Intellectuelle, est signalé par la mention «R.M.» (revendications modifiées).

PROCEDE DE PREPARATION DE CULTURES DE BACTERIES LACTIQUES

5
La présente invention concerne un nouveau procédé de préparation de cultures de bactéries lactiques, permettant un meilleur rendement, une meilleure survie et une meilleure conservation par rapport aux procédés classiquement utilisés.

10 Les procédés de fermentation dans l'industrie en vue de la préparation de levain nécessitent une reproductibilité de toutes les étapes. Une des étapes clef est le bon redémarrage des bactéries composant le levain. Ce redémarrage dépend de l'état des bactéries lactiques (BL) composant le levain et donc de sa
15 préparation. La préparation des levains fait intervenir des étapes lors desquelles les bactéries se trouvent en conditions de stress, par exemple par acidification du milieu (conséquence naturelle de la croissance des bactéries lactiques qui produisent de l'acide lactique), variation de température (froid pendant le stockage), présence ou absence d'oxygène. Ces différents facteurs altèrent la
20 survie des différentes bactéries composant le levain. Ainsi, les différences entre les lots de levain se révèlent être importantes et conduisent souvent à des productions de qualité variable. L'importance de ce problème met en lumière la nécessité de maîtriser certains paramètres de la production de levain.

25 Il existe un grand nombre d'information sur la capacité des bactéries lactiques à utiliser les sucres présents dans le milieu. Les sucres sont majoritairement convertis en acide lactique (produit majoritaire), acide acétique, et pour une faible part en acétoïne, diacétyl, éthanol, acide formique, ou CO₂. Une partie des sucres peut être stockée sous forme de glycogène par exemple ou
30 utilisée pour fabriquer des polymères telles que les exopolysaccharides. Les bactéries lactiques sont considérées comme des bactéries fermentaires strictes.

35 Par contre, peu d'études ont été effectuées sur la capacité des bactéries lactiques à utiliser le fer présent dans le milieu. Le besoin en fer pour la croissance et la survie des bactéries lactiques est cependant une donnée controversée. Ainsi, des études montrent (Sijpesteijn A.K., 1970, Antonie van Leeuwenhoek, 36 : 335-348) que du fer associé à un noyau protoporphyrrique (hémine ou hématine par exemple) pouvait être incorporé par certaines bactéries lactiques, alors que dans au moins une autre étude (Pandey A., *et al.*, 1994, *Appl. Microbiol. Biotech.* 40 : 735-

739) il a été montré que les bactéries lactiques ne peuvent pas internaliser le fer présent dans le milieu.

Lors de la préparation des levains, la croissance des bactéries est couplée à une diminution du pH du milieu qui, lorsque le pH atteint une valeur voisine de 4,5 induit l'arrêt des divisions cellulaires. Un bas pH diminue également la survie lors de la conservation des préparations bactériennes. Pour résoudre les problèmes liés à cette diminution de pH, les méthodes actuelles utilisent des milieux de culture tamponnés autour de pH 6 avec des cations associés à des carbonates, des hydroxydes, des phosphates ou des oxydes. La neutralisation du pH peut être faite soit en fin de croissance soit en continue. Cependant, ces apports dans le milieu de culture peuvent entraîner des problèmes pour les productions ultérieures. Par exemple, l'apport d'ions calcium lors de la neutralisation peut favoriser le développement de phages, et l'utilisation de levains contenant des ions phosphates ou des citrates peut conduire à un rendement de production fromagère plus faible car ces molécules augmentent la solubilité des caséines. Les bactéries ainsi préparées sont ensuite généralement conditionnées pour être soit congelées à une température d'environ -50°C soit lyophilisées puis stockées à -20°C ou à 4°C. Bien que les conditions soient parfaitement définies et contrôlées, il existe dans ces processus des conditions conduisant à la mort des cellules telles que des stress oxydants, osmotiques ou thermiques (froid).

La présente invention permet de résoudre ces problèmes grâce à un nouveau procédé de préparation permettant un meilleur rendement et une survie accrue des bactéries lactiques dans les levains.

L'invention a pour objet un procédé de préparation de cultures de bactéries lactiques comprenant une étape d'addition, dans le milieu de culture desdites bactéries, d'un composé contenant du fer sous forme incorporable dans les cytochromes bactériens, en association avec une étape d'aération du milieu de culture,

- ledit procédé ayant un rendement supérieur à celui d'un procédé ne comprenant ni la susdite addition dudit composé contenant du fer, ni la susdite aération, et

- ledit procédé permettant d'obtenir des cultures de bactéries lactiques dans lesquelles lesdites bactéries ont un taux de survie supérieur à celui résultant de la mise en œuvre d'un procédé ne comprenant ni la susdite addition dudit composé contenant du fer, ni la susdite aération.

Ce procédé de cultures de bactéries lactiques permet une augmentation du nombre de bactéries produites en fin de croissance, un maintien du pH final au environ de pH 6 sans avoir à tamponner le milieu, une survie prolongée à la température de croissance ou dans diverses conditions de conservation.

5 Par aération, on désigne l'augmentation ou le maintien de la teneur en oxygène présent dans le milieu de croissance.

L'aération peut être effectuée soit en agitant ou en brassant le milieu de croissance, soit en faisant passer de l'air ou un mélange gazeux contenant de l'oxygène dans le milieu de croissance.

10 Selon un mode de réalisation avantageux du procédé de l'invention, le composé contenant du fer est choisi parmi :

- des sels de fer, notamment chlorure ferreux, citrate ferrique, sulfate ferreux,

- des noyaux porphyriques, notamment hème, hémine, hématine ou cytohémine, notamment dihydrochlorure de coproporphyrine I, tétraéthyl ester de coproporphyrine III, sel disodique de protoporphyrine IX, dichlorure d'hématoporphyrine IX, tétraisopropyl ester ou tétraméthyl ester de coproporphyrine, tétraisopropyl ester ou tétraméthyl ester de coproporphyrine III, hématoporphyrine IX, hémoglobine, protoporphyrine IX, diméthyl ester de protoporphyrine IX, protoporphyrine IX zinc,

20 et le composé contenant du fer étant éventuellement en association avec de la chlorophylle ou ses dérivés.

De façon avantageuse, le composé contenant du fer est choisi parmi l'hémine ou l'hème.

25 Par chlorophylle, on désigne la chlorophylle a, la chlorophylle b. Un exemple de dérivé de la chlorophylle est la chlorophylline.

Selon un mode de réalisation avantageux du procédé de l'invention, le fer est présent à raison d'environ 1 à environ 200 milligrammes par litre de culture de bactéries.

30 Dans le procédé de l'invention, l'étape d'aération est une étape d'oxygénation du milieu de culture, l'oxygène étant présent à raison d'environ au moins 5 millimoles par litre de milieu de culture de bactéries.

De façon avantageuse dans le procédé de l'invention en fin de culture, le pH se maintient à environ 6, sans qu'il soit nécessaire de neutraliser les acides formés, notamment l'acide lactique.

35 Le fait que le pH se maintienne à environ 6 à la fin de la culture est un avantage car l'acidité est un facteur conduisant à la mortalité des cellules. La diminution du pH a également pour conséquence de limiter le développement

des bactéries (par arrêt du métabolisme) sans que le milieu soit forcément limité en nutriments.

On désigne par "fin de culture" l'arrêt des divisions cellulaires. Cet arrêt peut survenir à la suite de l'épuisement du milieu en un au moins de ces constituants, suite à l'acidification du milieu ou à un changement de température (refroidissement par exemple).

De façon avantageuse dans le procédé de l'invention, la quantité de glucose contenue dans le milieu de culture et convertie en acide lactique est inférieure à environ 40 % en poids de la quantité totale de glucose présente, et est avantageusement d'environ 5 % à environ 30 % de la quantité totale de glucose présente, le pH étant d'environ 5 à environ 7, sans ajuster régulièrement le pH ou tamponner le milieu.

Au cours de la culture, il y a principalement formation d'acides lactiques ou acétiques résultant de la transformation du glucose. Outre leur capacité acidifiante, ces acides organiques sont des composés toxiques pour les cellules. Le procédé de l'invention, ayant pour conséquence une production plus faible d'acides organiques (à savoir une production environ 2 à environ 10 inférieure à celle des procédés classiques), permet ainsi aux cellules d'avoir une meilleure survie, cette meilleure survie étant également observée lorsque le milieu est maintenu à un pH voisin de 7. L'acidification plus faible du milieu de culture a également pour conséquence de permettre une meilleure utilisation des composants du milieu de croissance. En effet, le maintien du pH à une valeur voisine de 6 et la faible concentration en acide organique sont des facteurs favorisant la croissance des cellules. Un autre avantage de ce procédé de préparation est que l'agitation associée à l'ajout d'hème entraîne une modification des voies de métabolisme des sucres permettant ainsi une production d'énergie par molécule de glucose (ou un autre sucre) plus importante, une partie de ces sucres peuvent ainsi être utilisés pour produire de la biomasse supplémentaire ou des métabolites secondaires.

Par bactéries lactiques, on désigne un groupe de bactéries appartenant à divers genres et utilisées dans des processus de fermentations de produits alimentaires. Ce groupe est principalement composé de bactéries dont le produit principal du métabolisme des hydrates de carbone est l'acide lactique. Cependant, des bactéries produisant de faibles quantités d'acide lactique (*Leuconostoc* et bactéries propioniques) sont incluses dans cette liste du fait de leur utilisation dans les processus de fermentation. Il s'agit généralement de bactéries lactiques des genres *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Propionibacterium*, et *Bifidobacterium*, ou de *Streptococcus salivarius*.

Selon un mode de réalisation de l'invention, à l'issue de la phase de culture des bactéries lactiques, la quantité de bactéries lactiques obtenue est environ au moins 2 fois, notamment environ 2 à environ 5 fois, supérieure à celle obtenue par un procédé de préparation de cultures de bactéries lactiques ne faisant intervenir ni composé contenant du fer, ni étape d'aération.

L'issue de la phase de culture des bactéries correspond à la fin de culture telle que définie ci-dessus.

Le procédé de l'invention est tel que les bactéries lactiques possèdent la propriété, lorsque la température est maintenue d'environ 20°C à environ 50°C, selon la température de croissance optimale des bactéries lactiques concernées, de présenter un taux de survie d'environ 80% à environ 100%, 2 à 4 jours après l'arrêt de la phase de culture,

et que 7 jours après l'arrêt de la phase de culture des bactéries lactiques, à la température d'environ 20°C à environ 50°C, selon la température de croissance optimale des bactéries lactiques concernées, les bactéries lactiques présentent un taux de survie d'environ au moins 2 fois, notamment environ au moins 10 fois, et notamment d'environ 10 à environ 10⁵ fois, supérieur au taux de survie de cultures de bactéries lactiques obtenues par un procédé de préparation ne faisant intervenir ni composé contenant du fer, ni étape d'aération.

Dans le procédé de l'invention, les bactéries lactiques sont conservées, à la température d'environ 4°C, et possèdent la propriété de présenter un taux de survie d'environ 100%, jusqu'à au moins 7 jours après l'arrêt de la phase de culture.

L'invention concerne également un procédé de conservation de culture de bactéries lactiques obtenues par mise en œuvre du procédé défini ci-dessus, comprenant une étape de congélation, notamment à une température d'environ -195°C à environ -20°C.

Au cours de la congélation, il peut être avantageux d'utiliser un cryoprotecteur choisi parmi les composés suivants :

glucose, lactose, raffinose, saccharose, tréhalose ; adonitol, glycérol, mannitol, méthanol, polyéthylène glycol, propylène glycol, ribitol ; alginate, bovine sérum albumine, carnitine, citrate, cystéine, dextran, diméthyl sulfoxyde, glutamate de sodium, glycine bêtaïne, glycogène, hypotaurine, lait écrémé, peptone, polyvinyle pyrrolidine, taurine.

De façon avantageuse, on utilise l'alginate, le glycérol, la glycine bêtaïne, le lait écrémé, le tréhalose et le saccharose, comme cryoprotecteur.

Le procédé de conservation des cultures de bactéries lactiques obtenues par mise en œuvre du procédé de l'invention peut comprendre ou non une étape de congélation, suivie d'une étape de lyophilisation, l'étape de congélation ou de lyophilisation pouvant avantageusement être précédée d'une étape de mise sous vide.

Le procédé de conservation de culture de bactéries lactiques obtenues par mise en œuvre du procédé de l'invention peut comprendre une étape de pulvérisation, ou d'atomisation sous vide, ou en atmosphère contrôlée, des cultures de bactéries lactiques.

L'invention concerne également les cultures de bactéries lactiques telles qu'obtenues selon le procédé de l'invention défini ci-dessus.

L'invention concerne également une culture de bactéries lactiques, caractérisée en ce que la quantité de glucose contenue dans le milieu de culture et convertie en acide lactique est inférieure à environ 40 % en poids de la quantité totale de glucose présente et est avantageusement d'environ 10 % à environ 30 % de la quantité totale de glucose présente, le pH étant d'environ 5 à environ 7, et le milieu de culture ne contenant pas de tampon.

L'invention concerne également une culture de bactéries lactiques telle que définie ci-dessus, possédant la propriété, lorsque la température est maintenue d'environ 20°C à environ 50°C, selon la température de croissance optimale des bactéries lactiques concernées, de présenter un taux de survie d'environ 80% à environ 100%, 2 à 4 jours après l'arrêt de la phase de culture et, 7 jours après l'arrêt de la phase de culture des bactéries lactiques, à la température d'environ 20°C à environ 50°C, les bactéries lactiques présentent un taux de survie d'environ au moins 2 fois, notamment environ au moins 10 fois, et notamment d'environ 10 à environ 10^5 fois supérieur au taux de survie de cultures de bactéries lactiques obtenues par un procédé de préparation ne faisant intervenir ni composé contenant du fer, ni étape d'aération.

L'invention concerne également une culture de bactéries lactiques telle que définie ci-dessus, conservées à la température d'environ 4°C, possédant la propriété de présenter un taux de survie d'environ 100%, 7 jours après l'arrêt de la phase de culture.

L'invention concerne également l'utilisation des cultures de bactéries lactiques obtenues par mise en œuvre d'un procédé selon l'invention, notamment des cultures telles que définies ci-dessus, pour des transformations de produits à usage alimentaire, ou pour une utilisation en tant que bactéries probiotiques.

Les cultures de bactéries lactiques peuvent être utilisées pour préparer des levains. Les levains obtenus par mise en œuvre du procédé de l'invention

peuvent par exemple être utilisés pour la fermentation des végétaux, la fabrication des pâtes à pain, de vins, de bière, et aussi des produits laitiers. Par levains, on désigne toutes préparations de bactéries utilisables pour l'ensemencement d'un milieu à transformer ou pour l'ensemencement d'un milieu en vue de production de molécules d'intérêt.

L'invention concerne également l'utilisation des cultures de bactéries lactiques obtenues par mise en œuvre d'un procédé selon l'invention, notamment des cultures définies ci-dessus, pour la préparation de molécules d'intérêt biotechnologique, telles que polymères de sucre, de texturants, de gélifiants, de polysaccharides, de probiotiques, de produits susceptibles de corriger la flore bactérienne, de protéines recombinantes, ou autres molécules biologiques (nucléotides, cofacteurs, acides aminés, etc.).

L'invention sera davantage illustrée à l'aide des figures et des exemples qui suivent.

D) Légende des figures

- Figure 1 : Croissance et survie de *Lactococcus lactis* cultivée et conservée à 30°C.

Cette figure représente la comparaison de la croissance, du nombre de bactérie obtenu en fin de croissance et de la survie lorsque les souches de bactéries lactiques (ici *Lactococcus lactis*) sont cultivées à 30°C, avec ou sans hémine et aération selon le procédé de l'invention. Le nombre de cellules viables (ordonnées) est exprimé en fonction du temps (nombre de jours après ensemencement, correspondant au temps zéro), la température de conservation des bactéries étant de 30°C. La courbe avec des cercles correspond au procédé de l'art antérieur (sans hémine), alors que celle avec des carrés correspond à la présence d'hémine dans le milieu de culture et à l'aération de ce dernier.

- Figure 2 : Croissance et survie de *Lactococcus lactis* cultivée à 30°C pendant 24h puis stockée à 4°C.

Cette figure représente la comparaison de la croissance, du nombre de bactérie obtenu en fin de croissance lorsque les souches de bactéries lactiques (ici *Lactococcus lactis*) sont cultivées à 30°C, et de la survie après transfert à 4°C 24h après l'ensemencement. La phase de culture à 30°C est effectuée dans un milieu avec ou sans hémine et aération selon le procédé de l'invention. Le

nombre de cellules viables (ordonnées) est exprimé en fonction du temps (nombre de jours après ensemencement), la température de conservation des bactéries étant de 4°C. La courbe avec des cercles correspond au procédé de l'art antérieur (sans hémine ni aération), alors que celle avec des carrés correspond à la présence d'hémine dans le milieu de culture et à l'aération de ce dernier.

II) Exemples

Lactococcus lactis est une bactérie qui, lorsqu'elle est cultivée en milieu riche, en lait ou selon l'art antérieur à cette invention, présente les caractéristiques suivantes :

- production d'acide lactique comme produit majoritaire du métabolisme des sucres (glucose ou lactose par exemple).
- Acidification du milieu jusqu'à une valeur de pH d'environ 4,5 dans un milieu contenant 1 % de glucose.

Cependant lorsque les bactéries sont cultivées dans les conditions décrites dans la présente invention, on peut observer que ces caractéristiques sont modifiées. Les expériences suivantes en apportent la démonstration.

1) Mise en évidence d'un meilleur rendement et du maintien du pH à une valeur voisine de 6 lorsque les bactéries lactiques sont cultivées selon le procédé de l'invention.

Les bactéries sont ensemencées dans un milieu de laboratoire (M17 supplémenté en glucose ou en lactose par exemple) au dilution de 1/100 ou de 1/1000 à partir d'une culture saturée cultivée pendant 24h à 30°C. De l'hémine à la concentration finale de 10 µg/ml [solution stock à 0,5 mg/ml (100 mg d'hémine dans 2 ml de NaOH 5N, puis ajouter 198 ml d'eau puis autoclaver à 120°C pendant 20 minutes)] est ensuite ajouté avant de mettre les cultures à 30°C sous agitation pour oxygéner les cultures (200 rotations par minute au minimum) (remarque, l'oxygénation pourrait être effectuée en faisant passer de l'air dans le milieu). Après 24h00 de croissance, des aliquotes sont prélevés pour mesurer la densité optique à 600 nm (DO_{600nm}), le nombre de bactéries viables, le pH final et la concentration en acide lactique du milieu (Tableau 1).

Tableau 1 : Effet de l'hémine et de l'aération du milieu en fonction de la concentration en glucose sur la DO (600 nm), le nombre de cellules viables, le pH, la production d'acide lactique après 24h de croissance

A: Culture sans hemin ni agitation

Concentration en glucose (g/l)	5		6		7		8		9		10	
Facteur de dilution	100	1000	100	1000	100	1000	100	1000	100	1000	100	1000
DO _{600 nm}	2,8	2,4	2,22	2,37	2,4	2,78	2,82	2,8	3,05	2,95	3,1	2,8
Compte de bactéries viables (x10 ⁹)	3,25	3,44	3,43	3,6	3,2	3,2	3,5	3,5	3,5	3,7	3,9	2,4
pH	5,77	5,74	5,51	5,52	5,13	5,19	4,96	4,92	4,71	4,65	4,56	4,55
Concentration en acide lactique (g/l)	non mesuré	3,3	non mesuré	4,8	non mesuré	4,9	non mesuré	6,5	non mesuré	6,9	non mesuré	8

B: Culture avec hémine et aération

Concentration en glucose (g/l)	5		6		7		8		9		10	
Facteur de dilution	100	1000	100	1000	100	1000	100	1000	100	1000	100	1000
DO _{600 nm}	4,6	4,5	5,1	5,5	5,6	5,7	5,9	5,4	5,9	5,8	6,1	6,2
Compte de bactéries viables (x10 ⁹)	5,7	5,7	6	7,6	9,1	8,6	8,9	9,3	9,2	9,4	10,1	9,6
pH	6,2	6,19	6,25	6,13	6,09	6,07	6,04	6,03	6,02	6,01	6,01	5,99
Concentration en acide lactique (g/l)	non mesuré	0,12	non mesuré	0,14	non mesuré	0,19	non mesuré	0,35	non mesuré	0,52	non mesuré	0,98

On peut observer dans le tableau 1 que la biomasse est toujours plus importante lorsque les cellules sont cultivées en présence d'hémine et d'oxygène. Cette augmentation est mise en évidence par les valeurs de Densité optique plus importante et par un nombre de cellules viables plus élevé lorsque les cellules sont cultivées en présence d'hémine et d'oxygène. On peut également noter que, lorsque les cellules sont cultivées en présence d'hémine et d'oxygène, le pH varie peu et reste stable autour d'une valeur d'environ 6,1 quelque soit la concentration en glucose testé alors que le pH diminue fortement (passage de 5,7 à 4,5 pour une concentration de glucose variant de 0,5% à 1%) pour les cellules cultivées dans les conditions classiques. On remarque

également que la production d'acide lactique par les cellules cultivées en présence d'hémine et d'oxygène est faible et représente toujours une valeur inférieure à 10% de la quantité de sucre ajouté alors que dans le cas des cellules cultivées dans les conditions classiques, environ 80% du glucose ajouté est retrouvé sous la forme d'acide lactique.

2) Mise en évidence d'une survie plus importante lors d'un stockage à 30°C.

Les bactéries sontensemencées à la dilution de 1/1000 à partir d'une culture saturée dans un milieu de laboratoire, M17 supplémenté avec 1% de glucose. Les cultures sont ensuite divisées en deux parts égales et de l'hémine à la concentration finale de 10µg/ml est ajouté dans une de ces deux cultures. La culture ne contenant pas d'hémine est incubée à 30°C sans agitation alors que celle contenant de l'hémine est incubée à 30°C avec agitation pour oxygéner les cultures (200 rotations par minute au minimum). Des aliquotes de ces deux cultures sont prélevés régulièrement pendant la phase de croissance exponentielle pour suivre la viabilité, la vitesse de croissance, et le pH. Après 24h de croissance, les cultures sont incubées (stockées) dans une étuve à 30°C sans agitation et des aliquotes sont prélevés toutes les 24h pour suivre la viabilité des cellules (Tableau 2 et Figure 1).

Tableau 2: Evolution de la survie lors du stockage à 30°C de cultures cultivées dans les conditions classiques ou en présence d'hémine et d'aération

Nombre de jours après l'ensemencement	0	1	2	3	5	6
M17 1% glucose	$9,5 \times 10^5$	$2,45 \times 10^9$	$4,5 \times 10^8$	$3,8 \times 10^6$	$2,2 \times 10^4$	$2,2 \times 10^2$
M17 1% glucose + hémine et aération	1×10^6	$1,76 \times 10^{10}$	$1,71 \times 10^{10}$	$5,32 \times 10^9$	$4,3 \times 10^8$	$8,5 \times 10^7$

On peut observer sur la courbe de la figure 1 une survie beaucoup plus importante des cellules cultivées en présence d'hémine et d'oxygène par rapport à celle cultivées dans les conditions classiques. Cette amélioration de la survie est visible après un jour de stockage. On observe qu'il n'y a pas de perte de viabilité pour les cellules cultivées en présence d'hémine et d'oxygène alors qu'on peut observer une mortalité de pratiquement 10 fois pour la souche cultivée dans les conditions classiques par rapport à la souche cultivée avec

aération en présence d'hémine. Cette mortalité est d'environ 10^7 fois pour la souche cultivée dans les conditions classiques après 6 jours de stockage à 30°C alors qu'elle n'est que d'environ 100 fois pour la souche cultivée avec aération en présence d'hémine.

5

3) Mise en évidence d'une survie plus importante lors d'un stockage à 4°C .

10

Les bactéries ont été cultivées comme dans l'expérience précédente mais le stockage, effectué 24h après l'ensemencement, est fait à 4°C au lieu de 30°C (Tableau 3 et Figure 2).

Tableau 3: Evolution de la survie lors du stockage à 4°C de cultures cultivées dans les conditions classiques ou en présence d'hémine et d'aération

15

Nombre de jours après l'ensemencement	0	1	2	3	7
M17 1% glucose	$9,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$	$1,9 \times 10^8$
M17 1% glucose + hémine et aération	$1,2 \times 10^6$	$1,56 \times 10^{10}$	$1,41 \times 10^{10}$	$1,35 \times 10^9$	$1,38 \times 10^8$

20

Il est significatif sur cette courbe que les cellules cultivées en présence d'hémine et d'oxygène présente une survie plus importante lors d'une conservation au froid (4°C) que des cellules cultivées dans les conditions classiques. Nous pensons que cette augmentation d'un facteur 10 est

25

représentative d'un meilleur état physiologique des cellules en fin de croissance.

REVENDECATIONS

5 1. Procédé de préparation de cultures de bactéries lactiques comprenant une étape d'addition, dans le milieu de culture desdites bactéries, d'un composé contenant du fer sous forme incorporable dans les cytochromes bactériens, en association avec une étape d'aération du milieu de culture,

- ledit procédé ayant un rendement supérieur à celui d'un procédé ne comprenant ni la susdite addition dudit composé contenant du fer, ni la susdite
10 aération, et

- ledit procédé permettant d'obtenir des cultures de bactéries lactiques dans lesquelles lesdites bactéries ont un taux de survie supérieur à celui résultant de la mise en œuvre d'un procédé ne comprenant ni la susdite addition dudit composé contenant du fer, ni la susdite aération.
15

2. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le composé contenant du fer est choisi parmi :

- des sels de fer, notamment chlorure ferreux, citrate ferrique, sulfate ferreux,

20 - des noyaux porphyriques, notamment hème, hémine, hématine ou cytohémine, notamment dihydrochlorure de coproporphyrine I, tétraéthyl ester de coproporphyrine III, sel disodique de protoporphyrine IX, dichlorure d'hématoporphyrine IX, tétraisopropyl ester ou tétraméthyl ester de coproporphyrine, tétraisopropyl ester ou tétraméthyl ester de coproporphyrine
25 III, hématoporphyrine IX, hémoglobine, protoporphyrine IX, diméthyl ester de protoporphyrine IX, protoporphyrine IX zinc, et le composé contenant du fer étant éventuellement en association avec de la chlorophylle ou ses dérivés.

30 3. Procédé selon l'une des revendications 1 ou 2, dans lequel le fer est présent à raison d'environ 1 à environ 200 milligrammes par litre de culture de bactéries.

35 4. Procédé selon l'une des revendications 1 à 3, dans lequel l'étape d'aération est une étape d'oxygénation du milieu de culture, l'oxygène étant présent à raison d'environ au moins 5 millimoles par litre de milieu de culture de bactéries.

5. Procédé selon l'une des revendications 1 à 4, caractérisé en ce qu'en fin de culture, le pH se maintient à environ 6, sans qu'il soit nécessaire de neutraliser les acides formés, notamment l'acide lactique.

5 6. Procédé selon l'une des revendications 1 à 5, dans lequel la quantité de
glucose contenue dans le milieu de culture et convertie en acide lactique est
inférieure à environ 40 % en poids de la quantité totale de glucose présente, et
est avantageusement d'environ 5 % à environ 30 % de la quantité totale de
10 glucose présente, le pH étant d'environ 5 à environ 7, sans ajuster régulièrement
le pH ou tamponner le milieu.

15 7. Procédé selon l'une des revendications 1 à 6, dans lequel les bactéries
lactiques sont choisies parmi *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*,
Propionibacterium, *Bifidobacterium*, ou *Streptococcus salivarius*.

20 8. Procédé selon l'une des revendications 1 à 7, dans lequel à l'issue de la
phase de culture des bactéries lactiques, la quantité de bactéries lactiques
obtenue est environ au moins 2 fois, notamment environ 2 à environ 5 fois,
supérieure à celle obtenue par un procédé de préparation de cultures de bactéries
lactiques ne faisant intervenir ni composé contenant du fer, ni étape d'aération.

25 9. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8,
dans lequel les bactéries lactiques possèdent la propriété, lorsque la
température est maintenue d'environ 20°C à environ 50°C, selon la température
de croissance optimale des bactéries lactiques concernées, de présenter un taux
de survie d'environ 80% à environ 100%, 2 à 4 jours après l'arrêt de la phase
de culture,

30 et dans lequel 7 jours après l'arrêt de la phase de culture des bactéries
lactiques, à la température d'environ 20°C à environ 50°C, selon la température
de croissance optimale des bactéries lactiques concernées, les bactéries lactiques
présentent un taux de survie d'environ au moins 2 fois, notamment environ au
moins 10 fois, et notamment d'environ 10 à environ 10⁵ fois, supérieur au taux
de survie de cultures de bactéries lactiques obtenues par un procédé de
préparation ne faisant intervenir ni composé contenant du fer, ni étape
35 d'aération.

10. Procédé selon l'une des revendications 1 à 8 dans lequel les bactéries
lactiques conservées, à la température d'environ 4°C, possèdent la propriété de

présenter un taux de survie d'environ 100%, jusqu'à au moins 7 jours après l'arrêt de la phase de culture.

5 11. Procédé de conservation de culture de bactéries lactiques obtenues par mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 8, comprenant une étape de congélation, notamment à une température d'environ -195°C à environ -20°C.

10 12. Procédé de conservation de culture de bactéries lactiques obtenues par mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 8, comprenant ou non une étape de congélation, suivie d'une étape de lyophilisation, l'étape de congélation ou de lyophilisation pouvant avantageusement être précédée d'une étape de mise sous vide.

15 13. Procédé de conservation de culture de bactéries lactiques obtenues par mise en œuvre du procédé selon l'une des revendications 1 à 9, comprenant une étape de pulvérisation, ou d'atomisation sous vide, ou en atmosphère contrôlée, des cultures de bactéries lactiques.

20 14. Culture de bactéries lactiques, caractérisée en ce que la quantité de glucose contenue dans le milieu de culture et convertie en acide lactique est inférieure à environ 40 % en poids de la quantité totale de glucose présente et est avantageusement d'environ 5 % à environ 30 % de la quantité totale de glucose présente, le pH étant d'environ 5 à environ 7, et le milieu de culture ne contenant pas de tampon.

25 30 35 15. Culture de bactéries lactiques selon la revendication 14, possédant la propriété, lorsque la température est maintenue d'environ 20°C à environ 50°C, selon la température de croissance optimale des bactéries lactiques concernées, de présenter un taux de survie d'environ 80% à environ 100%, 2 à 4 jours après l'arrêt de la phase de culture et, 7 jours après l'arrêt de la phase de culture des bactéries lactiques, à la température d'environ 20°C à environ 50°C, les bactéries lactiques présentent un taux de survie d'environ au moins 2 fois, notamment environ au moins 10 fois, et notamment d'environ 10 à environ 10⁵ fois supérieur au taux de survie de cultures de bactéries lactiques obtenues par un procédé de préparation ne faisant intervenir ni composé contenant du fer, ni étape d'aération.

16. Culture de bactéries lactiques selon la revendication 14, conservées à la température d'environ 4°C, possédant la propriété de présenter un taux de survie d'environ 100%, 7 jours après l'arrêt de la phase de culture.

5 17. Utilisation des cultures de bactéries lactiques obtenues par mise en œuvre d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, notamment des cultures selon l'une des revendications 14 à 16, pour des transformations de produits à usage alimentaire, ou pour une utilisation en tant que bactéries probiotiques.

10 18. Utilisation des cultures de bactéries lactiques obtenues par mise en œuvre d'un procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 13, notamment des cultures selon l'une des revendications 14 à 16 pour la préparation de molécules d'intérêt biotechnologique, telles que polymères de
15 sucre, de texturants, de gélifiants, de polysaccharides, de probiotiques, de produits susceptibles de corriger la flore bactérienne, de protéines recombinantes, ou autres molécules biologiques telles que nucléotides, cofacteurs, et acides aminés.

20

aération en présence d'hémine. Cette mortalité est d'environ 10^7 fois pour la souche cultivée dans les conditions classiques après 6 jours de stockage à 30°C alors qu'elle n'est que d'environ 100 fois pour la souche cultivée avec aération en présence d'hémine.

5

3) Mise en évidence d'une survie plus importante lors d'un stockage à 4°C .

10

Les bactéries ont été cultivées comme dans l'expérience précédente mais le stockage, effectué 24h après l'ensemencement, est fait à 4°C au lieu de 30°C (Tableau 3 et Figure 2).

15

Tableau 3: Evolution de la survie lors du stockage à 4°C de cultures cultivées dans les conditions classiques ou en présence d'hémine et d'aération

Nombre de jour après l'ensemencement	0	1	2	3	5
M17 1% glucose	$9,4 \times 10^5$	$2,4 \times 10^9$	$2,3 \times 10^9$	$2,1 \times 10^9$	$1,9 \times 10^8$
M17 1% glucose + hémine et aération	$1,2 \times 10^6$	$1,56 \times 10^{10}$	$1,41 \times 10^{10}$	$1,35 \times 10^{10}$	$1,38 \times 10^{10}$

20

Il est significatif sur cette courbe que les cellules cultivées en présence d'hémine et d'oxygène présente une survie plus importante lors d'une conservation au froid (4°C) que des cellules cultivées dans les conditions classiques. Nous pensons que cette augmentation d'un facteur 10 est représentative d'un meilleur état physiologique des cellules en fin de croissance.

25

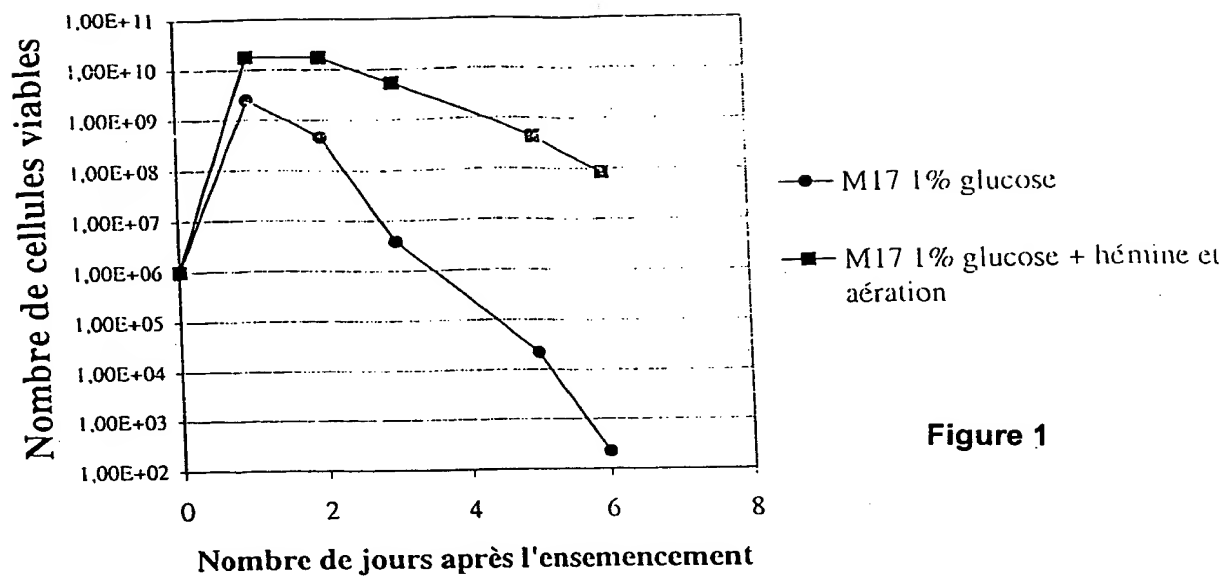


Figure 1

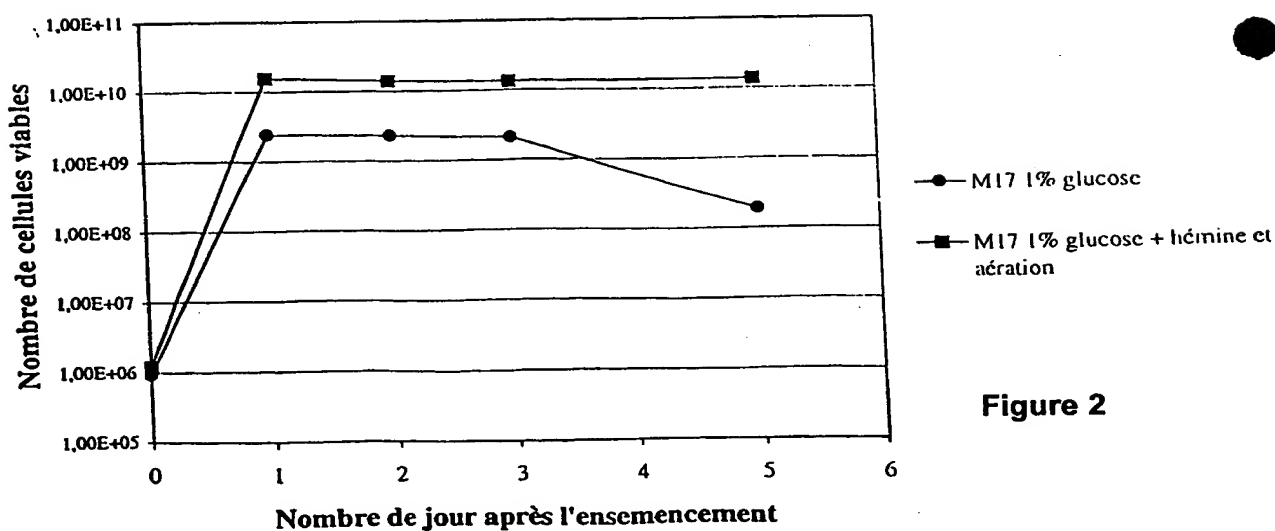


Figure 2